

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Direktor: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

Klinikum der Universität Regensburg

**Erhöhtes extrazelluläres Wasser
gemessen durch Bioimpedanz und
erhöhter Serumspiegel von atrialem
natriuretischen Peptid bei rheumatoider
Arthritis – Anzeichen von Volumenüberlastung**

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

**der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von Nadezhda Malinowski
(geb. Trendafilova)**

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12. 2014

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|--------------|---|-----------|
| | Verwendete Abkürzungen | 1 |
| 1. | Einleitung | 3 |
| 2. | Fragestellung und Studienziele | 6 |
| 3. | Patienten und Methoden | 7 |
| 3.1. | Patienten | 7 |
| 3.2. | Methoden | 9 |
| 3.2.1 | Bioelektrische Impedanzanalyse | 9 |
| 3.2.2 | Bestimmung von NT-pro-atrialem natriuretischen Peptid in Körperflüssigkeiten | 11 |
| 3.2.3 | Synovialgewebe-Superfusion | 11 |
| 3.2.4 | Immunhistochemie | 12 |
| 3.2.5 | Statistische Analysen | 12 |
| 4. | Ergebnisse | 13 |
| 4.1. | Fettmasse und Muskelmasse | 13 |
| 4.2. | Wasserverteilung bei RA-Patienten und bei gesunden Probanden | 14 |
| 4.3. | Phasenverschiebung bei RA-Patienten und bei gesunden Probanden | 17 |
| 4.4. | Spiegel des NT-pro-atrialen natriuretischen Peptids bei RA-Patienten | 19 |
| 4.5. | Abnahme des extrazellulären Wassers nach 14 Tagen intensivierter Therapie | 22 |
| 5. | Diskussion | 24 |

| | | |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| 6. | Zusammenfassung | 28 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 30 |
| | Danksagung | 35 |
| | Lebenslauf | 36 |

Verwendete Abkürzungen:

| | |
|------------|--|
| ANP | Atriales natriuretisches Peptid |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| BIA | Bioelektrische Impedanzanalyse |
| BMI | Body Mass Index |
| BNP | <i>Brain</i> natriuretisches Peptid |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DAS28 | <i>Disease Activity Score 28</i> |
| DMARDs | <i>disease-modifying anti-rheumatic drugs</i> |
| ECW | extrazelluläres Wasser |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| HHN- Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebenniere-Achse |
| ICW | intrazelluläres Wasser |
| Ko | Kontrolle |
| Korr | Korrektur |
| MAP | Mitogen aktiviertes Protein |
| n. a. | nicht anwendbar |
| n. m. | nicht gemessen |
| NFAT | Kern (Nuklear) Faktor von aktivierten T-Zellen |
| NSAIDs | nicht-steroidale Antirheumatika |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| SEM | <i>Standard Error of Mean</i> |
| SNS | Sympathisches Nervensystem |
| SPSS | <i>Statistik – Software</i> |
| TBW | Gesamtkörperwasser/ total body water |
| TNF | Tumornekrosefaktor |

1. Einleitung

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) ist eine allgemeine Erscheinung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) und anderen (9, 29, 37). Parallel zur Aktivierung des SNS beobachtet man eine annähernd normale Situation oder aber eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) mit leicht erhöhtem Cortisol-Spiegel bei RA-Patienten, die nicht mit Glukokortikoiden behandelt wurden (5, 10, 49). Die Aktivierung des SNS ist dominanter als die Aktivierung der HHN-Achse, was als Entkopplung der beiden Stressachsen erkannt wurde (20). Allerdings sind die Cortisolwerte in der Regel niedriger als dies in Gegenwart hoher Konzentrationen von zirkulierenden pro-inflammatorischen Zytokinen zu erwarten wäre (inadäquate Sekretion) (8, 23, 24, 49). Es wurde bisher postuliert, dass bei RA, in Bezug auf neurohormonale Phänomene, ein adaptives Energieumverteilungsprogramm gestartet wird, welches vom aktivierten Immunsystem benötigt wird (47). Energie- und Wasserregulierung sind eng verbunden, wie vor kurzem zusammengefasst wurde (47).

Da das SNS (12, 43) und die HHN-Achse mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) (16, 30) Stimulatoren der Wasser- und Natriumretention sind, erwartet man, dass RA-Patienten mit aktiviertem SNS und HHN-Achse Zeichen einer Volumenüberlastung zeigen. Einfache Messgrößen von intravasaler Volumenüberlastungen sind natriuretische Faktoren wie das *brain* natriuretische Peptid (BNP) und das atriale natriuretische Peptid (ANP), deren Erhöhung bei RA-Patienten unabhängig von myokardialen Problemen oder koronarer Herzkrankheit auftritt (7, 19, 38, 44, 45, 53) und in geringerem Ausmaße in Verbindung mit okkulten oder manifester Herzerkrankung gebracht werden konnte (7, 18, 19).

Es scheint, dass die entzündliche Situation positiv mit dem Serumspiegel des NT-pro-BNP korreliert (39, 45), und dass der erhöhte Serumspiegel nach Tumornekrosefaktor (TNF)-Therapie sinkt (27, 38). Dies zeigt an, dass eine entzündliche Situation die Bedingungen für eine Erhöhung des Serumspiegels des natriuretischen Peptids zu begünstigen scheint.

Des Weiteren wurde ein erhöhter Serumspiegel des NT-pro-BNP bei Patienten mit RA mit einer erhöhten Mortalität in Beziehung gebracht (34, 39).

Eine weitere klinisch anwendbare Technik zur Bestimmung der Körperflüssigkeit ist die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA).

Die BIA ist ein schnelles, reproduzierbares, nicht-invasives und einfach auszuführendes Verfahren für den Nachweis der Körperzusammensetzung (14). Nach fast drei Jahrzehnten der Validierung gegen ausgereifte Standardtechniken (z.B. Lit. (22-32, 51)), liefert die BIA zuverlässig Informationen über Gesamtkörperwasser (TBW), extrazelluläres Wasser (ECW), intrazelluläres Wasser (ICW), Fettmasse, Muskelmasse und den Phasenwinkel (14). Mit der BIA wird der Widerstand, die Reaktanz und die Phasenverschiebung gemessen, welche die Zeitverzögerung zwischen der angelegten Wechselspannung und dem dadurch erzeugten Wechselstrom ist (auch Phasenwinkel genannt) (14). Eine geringe Phasenverschiebung macht eine Vorhersage bezüglich der Mortalität bei HIV-Patienten sowie bei systemischer Sklerose (28, 36). Bezüglich der intravasalen Volumenüberlastung und bezüglich der natriuretischen Faktoren wurden wichtige Zielvariablen bei Hämodialyse-Patienten validiert (2, 6, 26). Jedoch wurde die BIA bisher nicht intensiv als Methode verwendet, um Patienten mit rheumatischen Erkrankungen zu untersuchen.

Die BIA wird in der Regel angewendet, um das Phänomen der kachektischen Fettsucht bei Patienten mit RA zu untersuchen (relativ hohe Fettmasse in Bezug auf Skelettmuskelmasse) (13, 31, 40, 41). Nur wenige Berichte zeigen BIA als Verfahren zur Messung von Flüssigkeitskompartimenten bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (3, 31), aber vergleichende Studien bei RA und gesunden Probanden fehlen. Es gibt eine Studie bei Patienten mit systemischer Sklerose, die auf Ernährungsaspekte, die Körperzusammensetzung und die Prognose fokussiert (28). Da bei Hämodialyse-Patienten Änderungen im extrazellulären Volumen von entzündlichen Zuständen abhängen (2),

könnten ähnliche Veränderungen bei RA insbesondere unter Berücksichtigung des aktivierten SNS und der HHN-Achse zu beobachten sein.

2. Fragestellung und Studienziele

Folgende Fragen sollten in dieser Studie beantwortet werden:

1. Zeigen RA-Patienten Zeichen von Volumenüberlastung, welche durch die BIA und Messung des NT-pro-ANP nachgewiesen werden können?

In Vorarbeiten wurde ANP ebenfalls im Synovialgewebe entdeckt und da der Plasmaspiegel von ANP mit der Entzündungssituation zusammenhängt (27, 38, 39, 45), entstand zusätzlich die Frage:

2. Sind erhöhte ANP-Werte durch ein Übertreten des im Synovialgewebe produzierten ANP in das Plasma zu erklären?

Solch ein Überlauf könnte ausschließen, dass erhöhte ANP-Werte mit einer Volumenüberlastung in Verbindung stehen.

3. Patienten und Methoden

3.1 Patienten

In dieser Studie wurden drei Gruppen von RA-Patienten und Kontrollen in drei getrennten Studienzweigen untersucht. An allen Studiengruppen haben nur Europäer teilgenommen. Die RA-Patienten erfüllten die von dem *American College of Rheumatology* (früher *American Rheumatism Association*) 1987 überarbeiteten Kriterien für RA (1). Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt. Alle Patienten wurden über den Zweck der Studie unterrichtet und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

In der ersten BIA-Studie wurden 31 Patienten mit RA und 78 gesunde Probanden zur Untersuchung herangezogen. Die RA-Patienten wurden jeweils mit gesunden Probanden nach Geschlecht (Tabelle 1), Alter (Tabelle 1), Grösse (167.0 vs. $166.5 \pm 2.1 \pm 1.1$ cm), Gewicht (74.7 ± 3.4 vs. 72.3 ± 1.0 kg) und *Body Mass Index* (26.7 ± 1.0 vs. 26.1 ± 0.4 kg/m²) verglichen

In der zweiten BIA-Studie wurden 8 vorbehandelte Patienten mit aktiver RA, vor und nach 14 Tagen der intensiven Therapie mit entweder Methotrexat, Prednisolon, oder beidem, je nach klinischem Zustand untersucht. Bei diesen Patienten wurde der *Disease Activity Score 28* (DAS28) bestimmt, um parallel die Krankheitsaktivität zu prüfen (43). Der Spiegel des NT-pro-ANP wurde bei 14 langjährig erkrankten RA-Patienten mit Kniegelenkersatzoperationen bestimmt und mit 15 alters- und geschlechtsangepassten gesunden Probanden in der dritten Teilstudie verglichen.

Das C-reaktive Protein und die Blutsenkungsgeschwindigkeit wurden mittels Standardlabortechniken ermittelt. Die Charakteristika aller Patienten sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Merkmale aller Patienten, die in der ANP / BNP Studie untersucht wurden. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, Prozentwerte sind in runden Klammern, Altersbereich (Jahre) in eckigen Klammern angegeben.

| | Bioimpedanz-Analyse * | | | Analyse der natriuretischen Faktoren | |
|--|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| | Gesunde Probanden | RA** | RA <i>Follow-up</i> Studie | Gesunde Probanden | RA |
| Anzahl | 78 | 31 | 8 | 15 | 14 |
| Alter (Jahre) | 53.1 \pm 1.4 [26-76] | 56.9 \pm 2.3 [27-74] | 55.3 \pm 5.3 [27-71] | 61.8 \pm 2.2 [48-75] | 63.9 \pm 2.8 [48-77] |
| Geschlecht (w/m) | 66/12 (85/15) | 21/10 (68/32) | 6/2 (75/25) | 7/8 (47/53) | 3/11 (79/21) |
| C-reaktives Protein, mg/l | n.m. | 30.1 \pm 7.1 | 17.3 \pm 9.0 | n.m. | 10.3 \pm 2.6 |
| BSG, mm 1. Stunde | n.m. | 31.1 \pm 6.3 | 22.5 \pm 8.2 | n.m. | 21.7 \pm 4.2 |
| Medikation | | | | | |
| NSAIDs | n.a. | 18 (58) | 0 (0) | n.a. | 10 (71) |
| Prednisolon (mg/d) | n.a. | 4.3 \pm 0.7 | 5.8 \pm 2.5 | n.a. | 3.6 \pm 0.7 |
| Anzahl der Patienten mit Prednisolon | n.a. | 20 (65) | 7 (88) | n.a. | 10 (71) |
| Methotrexat | n.a. | 2 (6) | 6 (75) | n.a. | 7 (50) |
| TNF Therapie | n.a. | 0 (0) | 0 (0) | n.a. | 1 (7) |
| Leflunomid | n.a. | 1 (3) | 0 (0) | n.a. | 2 (14) |
| Sulfasalazin | n.a. | 1 (3) | 0 (0) | n.a. | 1 (7) |
| Opioid Analgetika | n.a. | 0 (0) | 0 (0) | n.a. | 5 (36) |
| Protonenpumpen Inhibitoren | n.a. | 8 (26) | 0 (0) | n.a. | 11 (79) |
| Angiotensin-Converting-Enzym Inhibitoren | n.a. | 0 (0) | 0 (0) | n.a. | 5 (36) |

* Die Patienten in der Bioimpedanz-Studie wurden nach Geschlecht, Alter, Grösse, Gewicht und *Body Mass Index* (siehe Methoden) abgestimmt.

** Diese Patienten waren RA-Patienten beim ersten Besuch in unserem Zentrum ohne ausreichende Medikation. Abkürzungen: BSG, Blutsenkungsgeschwindigkeit; n.a., nicht anwendbar; n.m., nicht gemessen; NSAIDs, nicht-steroidale Antirheumatika; RA, rheumatoide Arthritis.

3.2 Methoden

3.2.1 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA)

Die BIA wurde mittels Messgerät der Firma *BioTekna Inc.* (Marcon – Venedig, Italien), durchgeführt. Dieses Gerät verwendet zwei Wechselströme mit zwei verschiedenen Frequenzen bei 50 kHz und bei 1.5 kHz (bi Frequenz-Messverfahren). Das Gerät nutzt alle Kompartimentmodelle der Körperzusammensetzung in einer Multi-Kompartiment-Methode (2C, 3C, 4C, 5C).

Gesamtkörperwasser (*Total body water (TBW)*) wurde aus der ersten Methode bei 50 kHz mit der folgenden Formel [1] abgeleitet:

Gesamtkörperwasser [Einheit: L] = (0.377 × Höhe [cm]² / R) + 0.140 × Gewicht[kg] – 0.080 × Alter [Jahre] + 2.90 × Geschlecht (0 für Frauen, 1 für Männer) + 4.65,

mit $R = \text{Round} \left(\text{Modul}_{50} \times \cos \left(\text{Phasenverschiebung}_{50} \times \frac{\pi}{180} \right) \right)$,

mit $\text{Modul}_{50} = \text{Quadratwurzel} (\text{Widerstand bei } 50\text{kHz}^2 + \text{Reaktanz bei } 50\text{kHz}^2)$, und
 $\text{Phasenverschiebung}_{50} = \text{Arkustanges} (\text{Reaktanz bei } 50\text{kHz} / \text{Widerstand bei } 50\text{kHz})$.

Extrazelluläres Wasser (ECW) wurde aus der zweiten Methode bei 1.5 kHz mit der folgenden Formel abgeleitet [2]:

$ECW \text{ [in L]} = 0.229 \times \text{Höhe [cm]}^2 / \text{Modul } 1.5 + 4.5$,

mit $\text{Modul } 1.5 = \text{Quadratwurzel} (\text{Widerstand bei } 1.5\text{kHz}^2 + \text{Reaktanz bei } 1.5\text{kHz}^2)$.

Intrazelluläres Wasser (ICW) wurde aus TBW und ECW gemäß der folgenden Formel abgeleitet [3]: $ICW [L] = TBW [L] - ECW [L]$.

Die in der Studie erwähnte **Phasenverschiebung** wurde unter Bedingungen bei 50 kHz nach der folgenden Formel abgeleitet [4]:

$\text{Phasenverschiebung}_{50} = \text{Arcustangens} (\text{Reaktanz bei } 50\text{kHz} / \text{Widerstand bei } 50\text{kHz})$.

Fettmasse wurde in der folgenden Art und Weise unter 50 kHz abgeleitet [5]:

Fettmasse [kg] = Körpergewicht [kg] - freie Fettmasse [kg],

mit freie Fettmasse [kg] = $(0.279 \times \text{Höhe [cm]}^2 / R) + 0.181 \times \text{Gewicht [kg]} + 0.231 \times \text{Höhe [cm]} - 0.0777 \times \text{Alter [a]} + 0.064 \times \text{Geschlecht (0 für Frauen, 1 für Männer)} - 14.94$,

wobei R wie oben bei TBW bestimmt wurde.

Skelettmuskelmasse wurde mit der 50 kHz-Methode bestimmt:

$\text{Skelettmuskelmasse [kg]} = 0.7294 \times \text{TBW [L]} - 6.7688$.

In der ersten BIA Studie wurde das TBW bei RA-Patienten entsprechend dem Verlust der Skelettmuskulatur und des Knochens, verglichen mit gesunden Probanden, auf folgende Weise korrigiert:

$\text{TBW}_{\text{korrigiert}} [L] = \text{TBW von RA Patienten [L]} + D1 \times 0.79 + D2 \times 0.31$,

mit $D1$ [kg] = Mittelwert der Skelettmuskulatur von gesunden Probanden [kg] –

Mittelwert der Skelettmuskulatur von Patienten mit RA [kg] und

Mit $D2$ [kg] = Mittelwert der Knochenmasse bei gesunden Probanden [kg] - Knochenmasse von RA-Patienten [kg].

$\text{TBW}_{\text{korrigiert}} [L]$ wurde in Prozent des Körpergewichtes angegeben. In ähnlicher Weise wurde ICW gemäß der Formel korrigiert: $\text{ICW}_{\text{korrigiert}} [L] = \text{TBW}_{\text{korrigiert}} [L] - \text{ECW [L]}$.

$\text{ICW}_{\text{korrigiert}} [L]$ wurde in Prozent von $\text{TBW}_{\text{korrigiert}} [L]$ angegeben.

3.2.2 Bestimmung von NT- pro-atrialem natriuretischen Peptid in Körperflüssigkeiten.

NT-pro-ANP wurde in Plasma, Gelenkflüssigkeit und Synovialgewebe-Superfusat (Methode siehe unten) mit einem kommerziell erhältlichen *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kit (Art. BI-20892, Biomedica, Wien, Österreich) ermittelt. Die Nachweisgrenze lag bei 0.050 nmol/l, und die Inter- und Intra-Assay - Variationskoeffizienten lagen unter 5%. Kreuzreaktivität gegenüber anderen natriuretischen Faktoren war kleiner als 1%.

3.2.3 Synovialgewebe-Superfusion

Synovialgewebeproben wurden unmittelbar nach dem Öffnen der Kniegelenkscapsel bei Patienten mit Kniegelenkersatzoperationen entnommen. Die Vorbereitung des Gewebes für die Histologie wurde wie beschrieben durchgeführt (50). Dabei wurde Synovialgewebe möglichst ohne Blutgefäße und Fettgewebe von bis zu 9 cm² verwendet. 8 Stücke von etwa 16 mm² wurden in 8 Superfusionskammern gegeben. Die Superfusionstechnik wurde bereits im Detail beschrieben (50). Nach Überführung in Superfusionskammern mit einem Volumen von 80 µl wurde Synovialgewebe mit serumfreiem Kulturmedium (RPMI 1640, 25 mM HEPES, 1% Penicillin/ Streptomycin, 30 µM Mercaptoethanol, 0.57 mM Ascorbinsäure, 1.3 mM Calcium) superfundiert. Die Superfusion wurde für 2 Stunden bei einer Temperatur von 37°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 66 ml/min ausgeführt. Das Superfusat wurde nach 2 Stunden gesammelt, sofort eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Immunhistochemie

Von den oben genannten frischen Synovialgewebe-Proben wurden etwa 8 ca. 0.8 cm² grosse Stücke für die Immunhistochemie eingesetzt. Die Proben wurden sofort in Gefrierschutzmedium (*Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande*) eingelagert und dann mittels flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung schockgefroren.

Daraufhin wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte mit Kaninchen-Anti-ANP polyklonalen Antikörpern inkubiert und über Nacht bei 4°C (*1:2000, bs-2040R Bioss, Woburn, MA, USA*) belassen. Die Bindung des Primärantikörpers wurde unter Verwendung eines sekundären polyklonalen Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers, der mit Meerrettich-Peroxidase (*1:100, p0448 Dako, Glostrup Dänemark*) und dem *ImmPACT-DAB* Substrat konjugiert war, visualisiert (*SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, USA*).

Als Negativkontrolle wurde je nach Herkunft des primären Antikörpers entweder unspezifisches Serum oder ein unspezifisches Isotyp Immunglobulin (IgG) verwendet.

3.2.5 Statistische Analysen

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Kastengrafiken geben die 90., 75., 50. (Median), 25. und 10. Perzentile an. Die Gruppenmediane wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-Tests* (*SPSS/PC, Advanced Statistics, V21.0, SPSS Inc., Chicago*) nicht-parametrisch verglichen. Ein dreifältiges Diagramm, so genannter *ternary plot*, wurde mittels TBW, ECW und ICW nach einer Normalisierung der Originaldaten mit Hilfe der *Sigmaplot Software V.11* (*Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland*) erstellt. Gepaarte Daten betreffend des Plasmaspiegels wurden mit dem Gelenkflüssigkeitsspiegel des NT-pro-ANP mittels *Wilcoxon-Test* (*SPSS*) verglichen. Ebenso wurden in einer *Follow-up*-Studie gepaarte Daten von Patienten mit RA am Beginn der Behandlung mit Daten 14 Tagen nach der Behandlung mittels *Wilcoxon-Test* (*SPSS*) verglichen. $p < 0.05$ war das Signifikanzniveau.

4. Ergebnisse

4.1 Fettmasse und Muskelmasse

Um die Messtechnik der Bioimpedanzanalyse (BIA) zu überprüfen und um die korrekte Handhabung der BIA zu bestätigen, wurde die Fett- und Skelettmuskelmasse bei gesunden Probanden und bei RA-Patienten bestimmt. RA-Patienten zeigten eine höhere Fettmasse und eine geringere Muskelmasse im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb. 1). Dies bestätigt die kachektische Fettsucht und den Muskelabbau bei RA-Patienten.

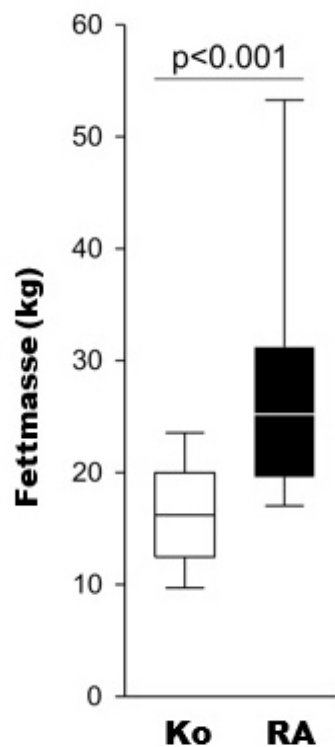


Abbildung 1A

Fettmasse bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

Box-Plots geben, die 90., 75., 50. (Median), 25., und 10. Perzentile an. Gruppenmediane wurde mit *Mann-Whitney-Test* verglichen.

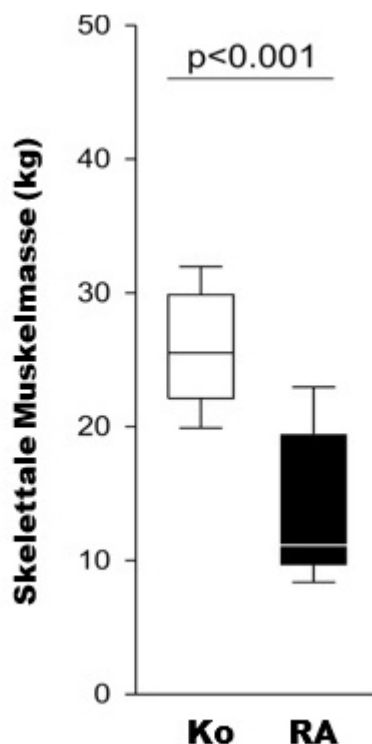


Abbildung 1B Muskelmasse bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

Box-Plots geben, die 90., 75., 50. (Median), 25., und 10. Perzentile an. Gruppemediane wurden mit *Mann-Whitney-Test* verglichen.

4.2 Wasserverteilung bei RA-Patienten und bei gesunden Probanden

In der ersten BIA-Studie zeigten RA-Patienten ein niedrigeres TBW als vergleichbare gesunde Probanden (Abb. 2A). Da RA-Patienten Muskel- und Knochenschwund entwickeln (beide enthalten Wasser), wurde TBW nach der angegebenen Formel korrigiert. Beim Vergleich der korrigierten TBW-Werte von RA-Patienten mit denen gesunder Personen ist es offensichtlich, dass die meisten der Unterschiede im TBW auf die krankheitsbedingten Skelettmuskel- und Knochenverluste zurückzuführen sind (Abb. 2A). Im Gegensatz dazu war ECW verglichen mit TBW bei RA-Patienten deutlich höher als bei gesunden Probanden, wobei eine ähnliche Korrektur des ECW für Muskel- / Knochenverlust nicht

notwendig war (Abb. 2B). Ausserdem war ICW verglichen mit TBW bei RA-Patienten niedriger als bei gesunden Probanden.

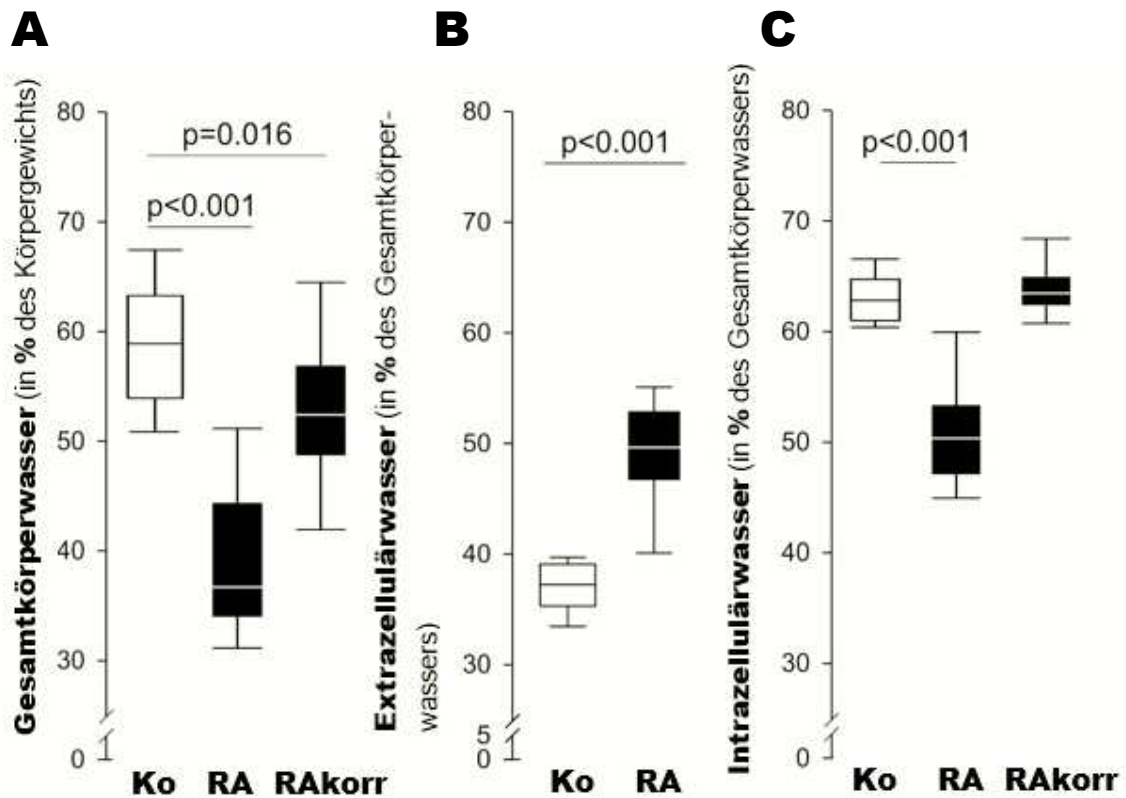


Abbildung 2

Wasserverteilung bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

A) Nachweis des Gesamtkörperwassers (TBW) in Prozent des Körpergewichts, abgeleitet bei der 50 kHz bioelektrischen Impedanz-Methode.

B) Extrazelluläres Wasser (ECW) in Prozent des Gesamtkörperwassers, abgeleitet bei der 1.5 kHz bioelektrischen Impedanz-Methode.

C) Intrazelluläres Wasser (ICW) in Prozent des Gesamtkörperwassers.

Für ICW erwies sich die Korrektur für Muskel- und Knochenverlust als sinnvoll, welche demonstrierte, dass korrigiertes ICW von RA-Patienten ähnlich dem der Kontrollpersonen war. Somit wird bei korrigiertem TBW und korrigiertem ICW, bei RA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, ein erhöhtes ECW beobachtet. Das Drei-Parameter-Diagramm (*ternary plot*) in **Abb. 2D** zeigt grundlegende Unterschiede für alle drei Messgrößen bei RA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen.

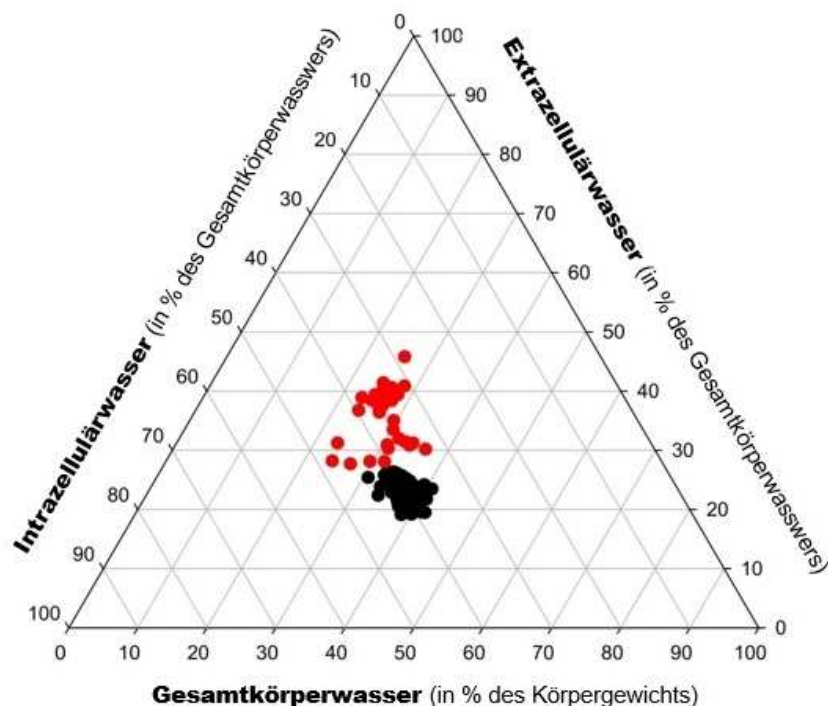


Abbildung 2D

Wasserverteilung bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

D) Ternary plot einschliesslich Gesamtkörperwasser, extrazelluläres Wasser und intrazelluläres Wasser in standardisierter Form nach *Sigmaplot Software*. Rot (schwarz) Symbole stellen RA-Patienten (gesunde Probanden) dar.

4.3 Phasenverschiebung bei RA-Patienten und bei gesunden Probanden

Die **Phasenverschiebung** ist ein prädiktiver Marker für die Mortalität bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen (28, 36). Sie gilt als Marker der Gewebeintegrität oder Normalität und wird weitgehend durch Mangelernährung beeinflusst (46). Bei RA-Patienten war die Phasenverschiebung deutlich geringer als im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb. 3A).

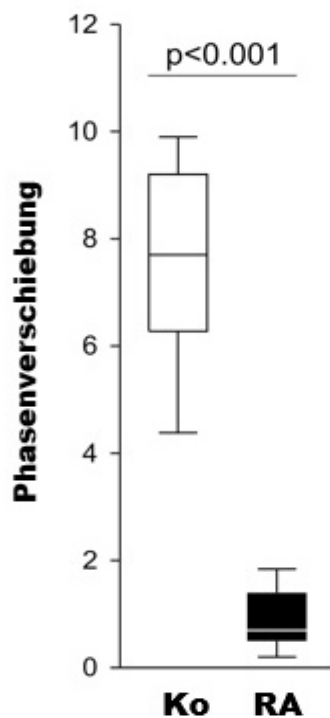


Abbildung 3A Phasenverschiebung bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

A) Phasenverschiebung. Box-Plots mit 90., 75., 50. (Median), 25., und 10. Perzentile. Gruppenmediane wurde mit *Mann-Whitney-Test* verglichen.

Dieser Unterschied war von Bedeutung, da kein gesunder Proband den Wert erreichte, welcher bei RA-Patienten beobachtet wurde (bei gesunden Probanden im Vergleich

zu RA-Patienten: 3.2 - 10.0 vs. 0.0 - 2.3). Die Darstellung der Phasenverschiebung in Beziehung zu ECW zeigte zwei völlig verschiedene Teilnehmergruppen (Abb. 3B).

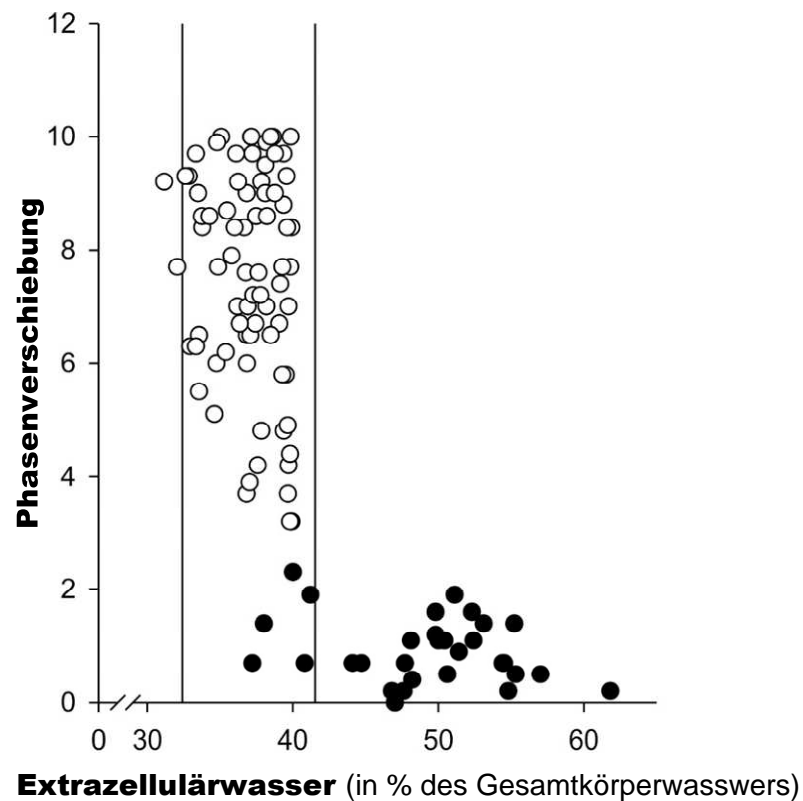


Abbildung 3B

Phasenverschiebung bei gesunden Probanden und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis.

B) Phasenverschiebung gezeigt über extrazelluläres Wasser in Prozent des Gesamtkörperwassers. Jedes Symbol repräsentiert ein Patient. Die vertikalen Linien geben die 95%-Konfidenzintervall von extrazellulärem Wasser in Prozent des Gesamtkörperwassers von Kontrollpersonen an.

Weisse Symbole = Normalpersonen;

Schwarze Symbole = Patienten mit RA

4.4 Spiegel des NT-pro-atrialen natriuretischen Peptids bei RA-Patienten

Bei den oben angegebenen Ergebnissen sind Anzeichen einer Volumenüberlastung zu erkennen, welche zusätzlich durch die Serumspiegel der natriuretischen Hormone untersucht werden können. Obwohl es zwei Ausreisser mit 16 und 20 nmol NT-pro-ANP pro Liter Plasma in der Gruppe von gesunden Probanden gab, zeigten Patienten mit RA einen signifikant höheren Plasmaspiegel des natriuretischen Faktors mit einem Mittelwert von über 2 nmol/l (Abb. 4A).

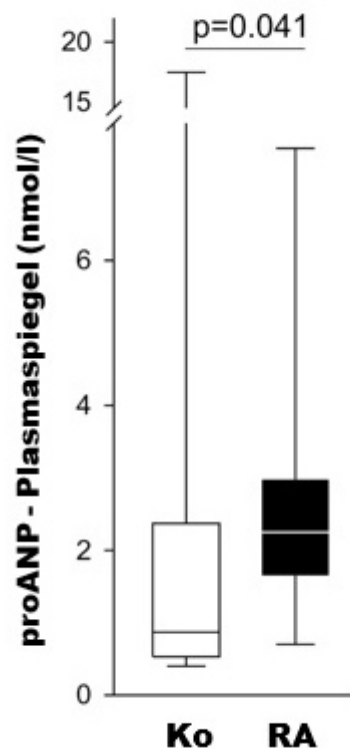


Abbildung 4A proANP bei gesunden Probanden (Ko) und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA).

Plasmaspiegel des NT-pro-ANP dargestellt als Box-Plots mit dem 90., 75., 50. (Mediane), 25., und 10. Perzentile. Gruppenmediane wurde mit *Mann-Whitney-Test* verglichen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Spiegel des NT-pro-ANP mit einer Entzündung korrelierte (27, 31, 38, 45) und ANP in Immunzellen wie Makrophagen nachgewiesen werden konnte (51), wurde untersucht, ob die synoviale ANP-Produktion für die Spiegelerhöhung des ANP im Plasma verantwortlich sein kann. Tatsächlich produzieren viele Zellen im Synovialgewebe ANP, welches sowohl im *lining*- als auch im *sublining* Bereich (Abb. 4B) nachweisbar war.

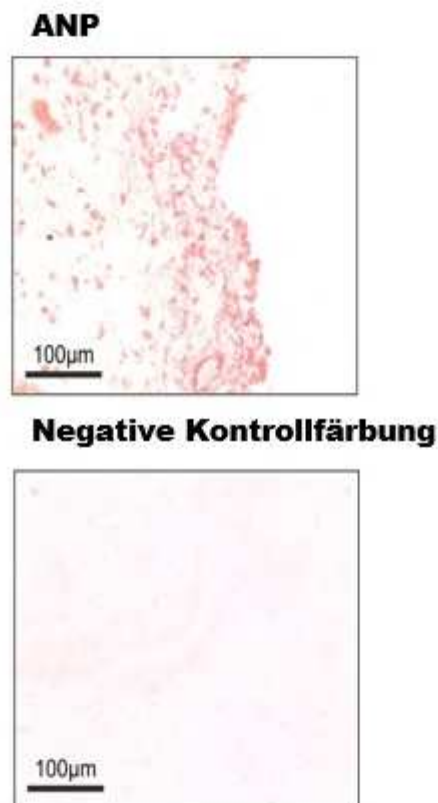


Abbildung 4B

Nachweis von ANP im Synovialgewebe bei Patienten mit RA.

Die Zahl der für ANP positiv gefärbten Zellen entsprach etwa der Anzahl an Makrophagen (mittlere Zelldichte für ANP-positiven Zellen in 14 RA-Patienten war 802.1 ± 91.6 Zellen/mm).

Der Spiegel des NT-pro-ANP lag im Synovialgewebssupernatant an der Nachweisgrenze (Bereich: 0.0 - 0.2 nmol/l, Daten nicht gezeigt) und in Synovialflüssigkeit zwischen 0.0 und 2.6 nmol/l, während sich der Plasmaspiegel zwischen 0.6 und 8.8 nmol/l bewegte (Abb. 4C).

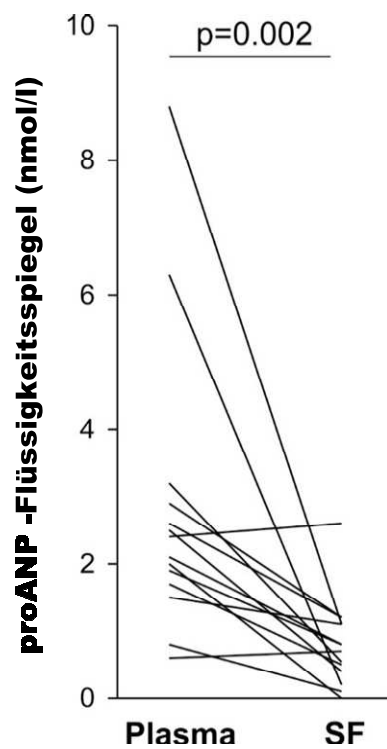


Abbildung 4C

Vergleich des Spiegels des NT-pro-ANP im Plasma und im Gelenk.

Jede Linie steht für einen Patienten mit RA. Der Vergleich wurde mit *Wilcoxon-Test* ausgeführt.

In den meisten Fällen war der Spiegel in Plasma höher als in Synovialflüssigkeit. Diese Ergebnisse zeigen einen systemischen Ursprung von NT-pro-ANP und schliessen das Synovialgewebe als Ort der Produktion von NT-pro-ANP aus.

4.5 Abnahme des extrazellulären Wassers nach 14 Tagen intensivierter Therapie

In einer longitudinalen BIA Studie wurden RA-Patienten von Anfang bis 14 Tage nach Beginn der intensivierten Behandlung beobachtet. Wie erwartet sank der DAS28 tendenziell (Abb. 5A). Gesamtkörperwasser (TBW) blieb relativ konstant, während Extrazellulärwasser (ECW) sank (Abb. 5B, C). Die Phasenverschiebung erhöhte sich tendenziell (5D). Obwohl die Zahl der beteiligten Patienten zu niedrig war, um signifikante Unterschiede zu erzielen, zeigte diese longitudinale Studie positive Behandlungseffekte in die erwartete Richtung.

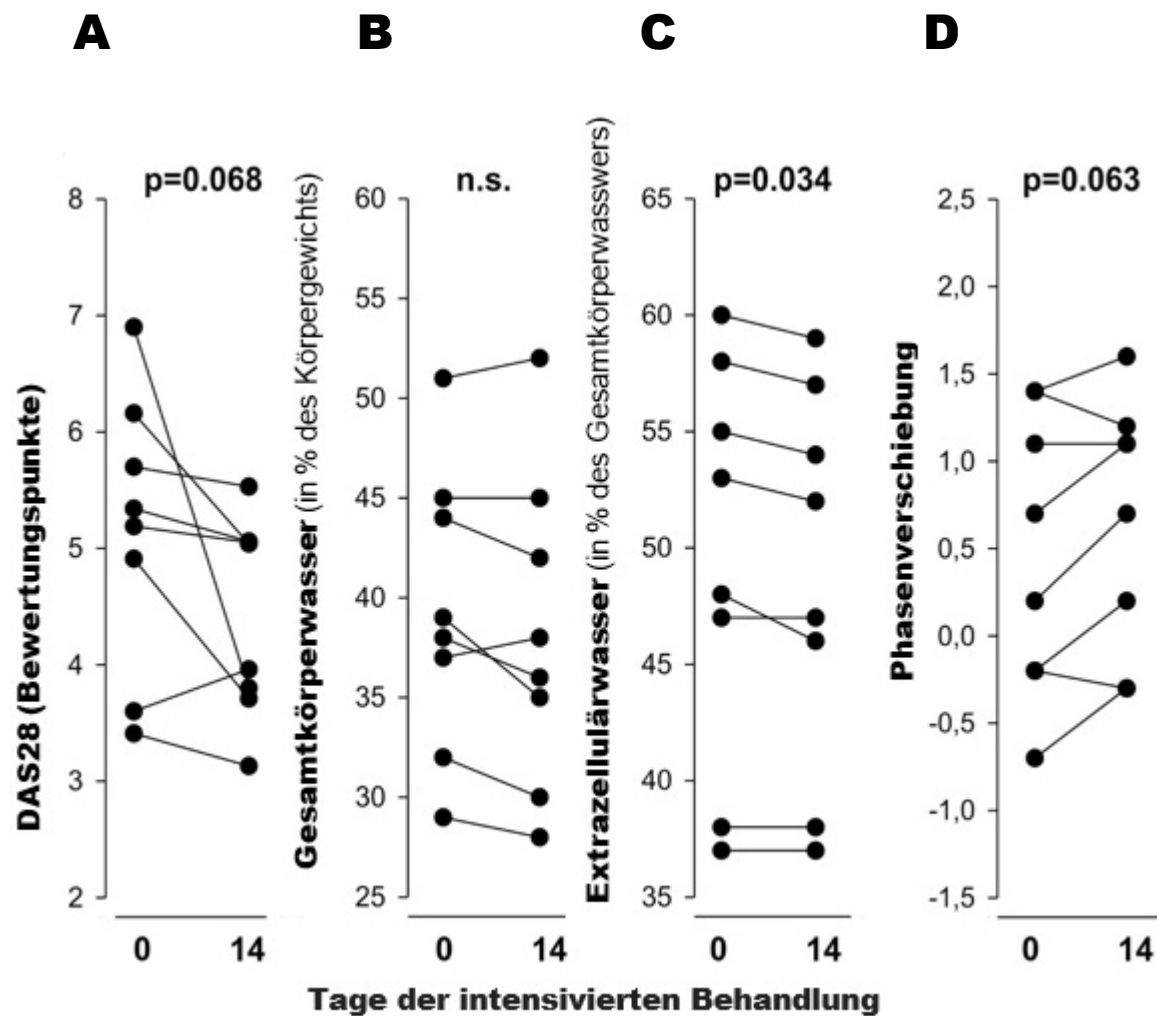


Abbildung 5 Veränderung der bioelektrischen Messgrößen bei RA-Patienten während der 14-tägigen intensivierten Behandlung. Jede Linie stellt ein RA-Patient dar. Der Vergleich wurde mit *Wilcoxon-Test* ausgeführt.

5. Diskussion

Diese Studie demonstriert bei RA-Patienten Zeichen der intravasalen/ extrazellulären Volumenüberlastung in Gegenwart von fast normalem korrigiertem TBW und ICW. Die Patienten mit RA unterschieden sich deutlich hinsichtlich der Wasserverteilung im Vergleich zu den gesunden Probanden. Nach unserem Wissen ist dies die erste BIA Studie bei RA-Patienten, die BIA Messgrößen mit dem Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide und longitudinaler BIA bei vorbehandelten Patienten mit RA kombiniert. Sie zeigt auch, dass die synoviale Produktion des ANP wahrscheinlich nicht die Hauptquelle des zirkulierenden ANP bei RA-Patienten ist.

Frühere Studien bei RA-Patienten konzentrierten sich vor allem auf die Körperzusammensetzung in Bezug auf die kachektische Fettsucht, Skelett- und Muskelmasse (z.B. Literatur (13, 41)). Die kachektische Fettsucht wurde in dieser Studie bestätigt. In der juvenilen idiopathischen Arthritis wies eine Studie niedriges TBW nach, während eine andere Studie über höheres TBW in den Kontrollen berichtete und, ähnlich wie hier, ein höheres ECW vorlag (3, 31). Abweichungen in diesen Studien können möglicherweise von nicht angepassten Körperzusammensetzungsmodellen bei Kindern stammen. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung von Bedogni et al., da diese Anpassungen im Jahr 1996 noch nicht verfügbar waren (3). Interessanterweise war die Wasserverteilung nie Gegenstand der rheumatologischen Forschung, obwohl diese Frage häufig bei Hämodialyse Patienten behandelt wird, bei denen das Problem deutlich offensichtlicher ist (2, 6, 26).

Das Interesse an der Volumenüberlastung begann, als basierend auf theoretischen Überlegungen erkannt wurde, dass die Energieregulierung durch das SNS und die HHN-Achse fest mit der Wasserregulierung gekoppelt ist (47). Wasserverlust ist ein typisches Merkmal akut entzündlicher Erkrankungen, der verschiedene Ursachen haben kann:

- i) Es gibt lokalen Wasserverlust aus entzündetem Gewebe wie Verdunstung aus Wunden, lokale Sekretion aus entzündetem Gewebe in den Magen-Darm-Trakt (Durchfall, Erbrechen), lokale Sekretion in entzündeten oberen und unteren Atemwege (Rhinitis, Schweiß, Auswurf), oder als Flüssigkeitsverschiebungen in Brusthöhle, Bauchhöhle, und ähnliche,
- ii) es gibt den Wasserverlust im System bei Respiration, durch Schweiß und Schwitzen bei Fieber und bei entzündungsbedingter Freistellung von energiereichen Substraten zur Aktivierung des Immunsystems (Wasser wird benötigt zum Abbau von Energiespeicherformen wie Triglyceride und Glykogen, für die Glukoneogenese aus Laktat im Cori Zyklus, für Muskelabbau im Zusammenhang mit der Kachexie und der Bereitstellung von Aminosäuren für die Gluconeogenese) und
- iii) Wasserverlust resultierend im Rahmen der Zellproliferation (z. B. Leukozyten-Proliferation in Lymphgewebe), da Wasser für die Erzeugung von komplexen Strukturen wie Membranen und DNA usw. benötigt wird.

Es wurde vor kurzem zusammengefasst, dass das SNS und die HHN-Achse maßgeblich bei der Bereitstellung energiereicher Substrate und bei der Aktivierung des Immunsystems sind (48). Sie sind Teil der Energieumverteilungsreaktion (48). Ebenso sind das SNS und die HHN-Achse die wichtigsten endogenen Systeme für Natrium- und Wasserretention (12, 16, 30, 42, 43). Beide Stressachsen sind bei RA aktiviert (siehe Einleitung). Da viele Wirkmechanismen bei akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen ähnlich sind, sollten Wassereinlagerungen ein typisches Merkmal bei chronisch-entzündlichen Krankheiten sein. Es gab schon einige gute Hinweise dafür, dass intravasale Volumenüberlastung bei RA-Patienten besteht, weil die natriuretischen Faktoren bei diesen Patienten unabhängig von einer Schädigung des Herzmuskels, der Klappen-, oder der Koronargefäße erhöht waren (7, 19, 38, 44, 45, 53). Jedoch wurden Erhöhungen der natriuretischen Faktoren als myokardiale Dysfunktion interpretiert, egal ob okkulte oder

offene, allerdings war die intravasale Volumenüberlastung nicht im Fokus. Ähnlich war ein erhöhter Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide mit einer schlechten Prognose bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden (28, 34, 39), allerdings bleibt die Frage nach der Reihenfolge der Ereignisse offen.

Es wird das folgende Szenario bei RA vorgeschlagen:

- 1) Entzündungen im Gelenkgewebe und in lymphatischen Organen führen zur Sekretion von Zytokinen und zur Aktivierung von sensiblen Nervenfasern,
- 2) Zirkulierende Zytokine und Zytokin-aktivierte sensible Nervenfasern stimulieren das SNS und die HHN-Achse (Energieumverteilungsreaktion) (9, 48). Zusätzlich induzieren das SNS und die HHN-Achse eine Natrium- und Wasserretention, die zu intravasaler Volumenüberlastung führt.

Diese Mechanismen sind eindeutig für akute, nicht lebensbedrohliche Entzündungsepisoden selektioniert worden, werden aber in ähnlicher Weise bei chronischen Entzündungskrankheiten eingesetzt (47). Man vermutet, dass die dauerhafte Nutzung dieser Mechanismen zur höheren Mortalität beiträgt.

Da die Phasenverschiebung bei RA im Vergleich zu den Kontrollen stark unterschiedlich war, ist diese besondere Messgrösse hier hervorgehoben. Eine hohe Phasenverschiebung bei BIA ist abhängig von intakten, nicht leitenden Zellmembranen und intakten *tight junctions* zwischen den Zellen, die wie Kondensatoren in einem Wechselstromkreis funktionieren, und die für den elektrischen Widerstand verantwortlich sind (14). Hyperosmolarität kann die Funktion des Kondensators verringern, was zu geringerem elektrischen Widerstand im Wechselstromkreis führt (4). Je höher die Hyperosmolarität ist, desto geringer ist der Widerstand über einen großen Frequenzbereich (4).

An Orten der Entzündung werden viele Moleküle in der Nähe der Zellen sezerniert, was zu Hyperosmolarität führt (25). Hyperosmolarität selbst stimuliert eine pro-inflammatorische

Kaskade in diesen Zellen, die zur Aktivierung von p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-kinase) und NFAT5 führt (25). NFAT5 stimuliert die Transkription von Hyperosmolarität-responsiven Genen, deren Proteinprodukte für die Synthese, Aufnahme und intrazelluläre Akkumulation von kleinen organischen Osmolyten verantwortlich sind (25). Dies soll der extrazellulären Hyperosmolarität entgegenwirken, und dies führt zu einem Gleichgewicht der intra- und extrazellulären Osmolarität. In Anbetracht der niedrigen Phasenverschiebung bei RA, wird angenommen, dass eine entzündungsbedingte Hyperosmolarität vorliegt, die zu Problemen von Membranen und *tight junctions* führt.

Die Studie bestätigte die Richtigkeit der BIA-Technik bei RA-Patienten mit kachektischer Fettleibigkeit und mit Sarkopenie. Die BIA zeigte ein hohes ECW als Zeichen der intravasalen Volumenüberlastung. Die intravasale Volumenüberlastung wurde durch den erhöhten Spiegel des NT-pro-ANP bestätigt. Da chronische intravasale Volumenüberlastung zu Herz-Kreislauf-Folgeerscheinungen führen kann, und da BIA sehr vorhersagekräftig ist (28, 36), könnte die Technik der BIA (z.B. Modell BIA-ACC) ein wichtiges Instrument zur Diagnose einer Volumenüberlastung sein. Ähnlich wie bei Patienten unter Hämodialyse könnte BIA als wertvolles Instrument bei rheumatischen Erkrankungen etabliert werden, um Risikopatienten zu erkennen und entsprechend mit geeigneten blutdrucksenkenden Medikamenten zu behandeln.

6. Zusammenfassung

Akute entzündliche Episoden wie Infektionen stimulieren Wassereinlagerungen, die hauptsächlich durch das sympathische Nervensystem (SNS, darunter Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) sowie durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (HHN; Cortisol / Aldosteron) initiiert werden. Dies ist ein wichtiger Ausgleichsmechanismus bei dem zu erwartenden Wasserverlust durch Schwitzen, Fieber etc. Da das SNS und die HHN-Achse bei der rheumatoiden Arthritis (RA) aktiviert werden und auch eine Wasserretention bedingen können, wird eine Volumenbelastung erwartet, die in dieser Studie untersucht wurde.

Mit der Bioimpedanz-Analyse (BIA Modell-ACC) wurde die Körperzusammensetzung untersucht. Der Spiegel des NT-pro-atrialen-natriuretischen Peptids (ANP) wurde mittels ELISA gemessen und durch Immunhistochemie im Gelenkgewebe nachgewiesen. Eine Gruppe von 8 vorbehandelten RA-Patienten wurde vor und 14 Tage nach Beginn der Therapie mit Methotrexat und Prednisolon getestet.

Das extrazelluläre Wasser war deutlich höher bei RA im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Mittelwert \pm SEM: 49.1 ± 1.0 versus 37.0 ± 0.3 % des Gesamtkörperwassers (*Total Body Water*) (TBW), $p < 0.001$).

Außerdem war die Fettmasse bei RA-Patienten höher als bei den Kontrollen (28.7 ± 2.3 vs. 16.4 ± 0.6 kg, $p < 0.001$), wohingegen die Skelettmuskelmasse der RA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen reduziert war (14.4 ± 1.1 vs. 26.0 ± 0.6 kg, $p < 0.001$).

Der Plasmaspiegel des ANP war bei RA höher als bei Kontrollen. RA-Patienten exprimierten ANP im Synovialgewebe, wobei der Spiegel der Synovialflüssigkeit sowie der Spiegel des Superfusats viel geringer als der Plasmaspiegel war. Der Spiegel des extrazellulären Wassers sank bei RA-Patienten nach Beginn der Behandlung mit *disease-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARDs) ($p = 0.034$).

Diese Studie weist auf eine intravaskuläre Volumenüberlastung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis hin. Voraussichtlich führen diese zur Entwicklung von Bluthochdruck und den daraus resultierenden Herz-Kreislauf Folgeerscheinungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
2. Avila-Diaz M, Ventura MD, Valle D, Vicente-Martinez M, Garcia-Gonzalez Z, Cisneros A et al. Inflammation and extracellular volume expansion are related to sodium and water removal in patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2006;26:574-80.
3. Bedogni G, Polito C, Severi S, Strano CG, Manzieri AM, Alessio M et al. Altered body water distribution in subjects with juvenile rheumatoid arthritis and its effects on the measurement of water compartments from bioelectric impedance. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:335-9.
4. Bellotti M, Bast W, Berra A, Bonetto FJ. Effects of osmolarity on human epithelial conjunctival cells using an electrical technique. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1875-82.
5. Catley D, Kaell AT, Kirschbaum C, Stone AA. A naturalistic evaluation of cortisol secretion in persons with fibromyalgia and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2000;13:51-61.
6. Crepaldi C, Lamas EI, Martino FK, Rodighiero MP, Scalzotto E, Wojewodzka-Zelezniakowicz M et al. Bioimpedance and brain natriuretic peptide in peritoneal dialysis patients. *Contrib Nephrol* 2012;178:174-81.
7. Crowson CS, Myasoedova E, Davis JM, III, Roger VL, Karon BL, Borgeson D et al. Use of B-type natriuretic peptide as a screening tool for left ventricular diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis patients without clinical cardiovascular disease. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:729-34.
8. Cutolo M, Foppiani L, Minuto F. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis impairment in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *J Endocrinol Invest* 2002;25:19-23.
9. Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL, Bijlsma JW, van Doornen LJ. Elevated sympathetic nervous system activity in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:63-70.

10. Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL, van Doornen LJ, Bijlsma JW. Diurnal rhythm of salivary cortisol levels in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:465-7.
11. Deurenberg P, Tagliabue A, Schouten FJ. Multi-frequency impedance for the prediction of extracellular water and total body water. *Br J Nutr* 1995;73:349-58.
12. DiBona GF. Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension* 2003; 41:621-624
13. Elkan AC, Engvall IL, Cederholm T, Hafstrom I. Rheumatoid cachexia, central obesity and malnutrition in patients with low-active rheumatoid arthritis: feasibility of anthropometry, Mini Nutritional Assessment and body composition techniques. *Eur J Nutr* 2009;48:315-22.
14. Ellis KJ. Human body composition: in vivo methods. *Physiol Rev* 2000;80:649-80.
15. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum Dis Clin North Am* 2009;35:745-viii.
16. Giordano R, Di VL, Lanfranco F, Broglio F, Benso A, Gianotti L et al. Elderly subjects show severe impairment of dehydroepiandrosterone sulphate and reduced sensitivity of cortisol and aldosterone response to the stimulatory effect of ACTH(1-24). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:259-65.
17. Hansen RD, Raja C, Aslani A, Smith RC, Allen BJ. Determination of skeletal muscle and fat-free mass by nuclear and dual-energy x-ray absorptiometry methods in men and women aged 51-84 y (1-3). *Am J Clin Nutr* 1999;70:228-33.
18. Harney SM, Timperley J, Daly C, Harin A, James T, Brown MA et al. Brain natriuretic peptide is a potentially useful screening tool for the detection of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:136. doi:10.1136/ard.2005.040634
19. Haupl T, Burmester GR, Giannitsis E, Rohrlach T, Spanuth E, Parsch H et al. N-terminal prohormone brain natriuretic peptide: a biomarker for detecting cardiovascular risks in patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis? *Ann Rheum Dis* 2007;66:838-9.
20. Härle P, Straub RH, Wiest R, Mayer A, Schölmerich J, Atzeni F et al. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann Rheum Dis* 2006;65:51-6.

21. Heitmann BL. Body fat in the adult Danish population aged 35-65 years: an epidemiological study. *Int J Obes* 1991;15:535-45.
22. Heymsfield SB, Wang Z, Baumgartner RN, Ross R. Human body composition: advances in models and methods. *Annu Rev Nutr* 1997;17:527-58.:527-58.
23. Imrich R, Vlcek M, Aldag JC, Kerlik J, Radikova Z, Rovensky J et al. An endocrinologist's view on relative adrenocortical insufficiency in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1193:134-8 doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05362.x.:134-8.
24. Jessop DS, Harbuz MS. A defect in cortisol production in rheumatoid arthritis: why are we still looking? *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1097-100.
25. Kino T, Takatori H, Manoli I, Wang Y, Tiulpakov A, Blackman MR et al. Brx mediates the response of lymphocytes to osmotic stress through the activation of NFAT5. *Sci Signal* 2009;2:ra5.
26. Kotanko P, Levin NW, Zhu F. Current state of bioimpedance technologies in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:808-12.
27. Kotyla PJ, Owczarek A, Rakoczy J, Lewicki M, Kucharz EJ, Emery P. Infliximab treatment increases left ventricular ejection fraction in patients with rheumatoid arthritis: assessment of heart function by echocardiography, endothelin 1, interleukin 6, and NT-pro brain natriuretic peptide. *J Rheumatol* 2012;39:701-6.
28. Krause L, Becker MO, Brueckner CS, Bellinghausen CJ, Becker C, Schneider U et al. Nutritional status as marker for disease activity and severity predicting mortality in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1951-7.
29. Kuis W, Jong-de Vos v, Sinnema G, Kavelaars A, Prakken B, Helders PM et al. The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 1996;10:387-98.
30. Lanfranco F, Gianotti L, Picu A, Fassino S, Abbate DG, Mondelli V et al. The adrenal sensitivity to ACTH stimulation is preserved in anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest* 2004;27:436-41.
31. Lofthouse CM, Azad F, Baildam EM, Akobeng AK. Measuring the nutritional status of children with juvenile idiopathic arthritis using the bioelectrical impedance method. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1172-7.
32. Lukaski HC, Bolonchuk WW. Estimation of body fluid volumes using tetrapolar bioelectrical impedance measurements. *Aviat Space Environ Med* 1988;59:1163-9.

33. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders WA. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol* 1986;60:1327-32.
34. Mirjafari H, Welsh P, Verstappen SM, Wilson P, Marshall T, Edlin H et al. N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and mortality risk in early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Registry (NOAR). *Ann Rheum Dis* 2014;73:684-690
35. Nelson ME, Fiatarone MA, Layne JE, Trice I, Economos CD, Fielding RA, *et al.* Analysis of body-composition techniques and models for detecting change in soft tissue with strength training. *Am J Clin Nutr* 1996;63:678-86.
36. Ott M, Fischer H, Polat H, Helm EB, Frenz M, Caspary WF et al. Bioelectrical impedance analysis as a predictor of survival in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;9:20-5.
37. Perry F, Heller PH, Kamiya J, Levine JD. Altered autonomic function in patients with arthritis or with chronic myofascial pain. *Pain* 1989;39:77-84.
38. Peters MJ, Welsh P, McInnes IB, Wolbink G, Dijkmans BA, Sattar N et al. Tumour necrosis factor {alpha} blockade reduces circulating N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in patients with active rheumatoid arthritis: results from a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1281-5.
39. Provan S, Angel K, Semb AG, Atar D, Kvien TK. NT-proBNP predicts mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from 10-year follow-up of the EURIDISS study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1946-50.
40. Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, B Dawson-Hughes B et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest* 1994;93:2379-86.
41. Roubenoff R, Roubenoff RA, Ward LM, Holland SM, Hellmann DB. Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. *J Rheumatol* 1992;19:1505-10.
42. Schlaich MP, Krum H, Sobotka PA. Renal sympathetic nerve ablation: the new frontier in the treatment of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:39-46.
43. Schrier RW. Decreased effective blood volume in edematous disorders: what does this mean? *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2028-31.

44. Shichiri M, Miyasaka N, Hirata Y, Ando K, Marumo F. Appearance of beta-human atrial natriuretic peptide in collagen disease. *J Endocrinol* 1991;130:159-61.
45. Solus J, Chung CP, Oeser A, Avalos I, Gebretsadik T, Shintani A et al. Amino-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2662-9.
46. Stobaus N, Pirlich M, Valentini L, Schulzke JD, Norman K. Determinants of bioelectrical phase angle in disease. *Br J Nutr* 2012;107:1217-20.
47. Straub RH. Evolutionary medicine and chronic inflammatory state – known and new concepts in pathophysiology. *J Mol Med* 2012;90:523-34.
48. Straub RH, Cutolo M, Buttgerit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med* 2010;267:543-60.
49. Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to IL-6 and TNF in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:654-62.
50. Straub RH, Rauch L, Fassold A, Lowin T, Pongratz G. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:3450-60.
51. Vollmar AM, Schulz R. Gene expression and secretion of atrial natriuretic peptide by murine macrophages. *J Clin Invest* 1994;94:539-45.
52. Wang Z, Heymsfield SB, Chen Z, Zhu S, Pierson RN. Estimation of percentage body fat by dual-energy x-ray absorptiometry: evaluation by in vivo human elemental composition. *Phys Med Biol* 2010;55:2619-35.
53. Yasuda M, Yasuda D, Tomooka K, Nobunaga M. Plasma concentration of human atrial natriuretic hormone in patients with connective tissue diseases. *Clin Rheumatol* 1993;12:231-5.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Rainer Straub bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt teilzuhaben. Es war für mich eine grosse Ehre, Baustein für das Entstehen dieser Arbeit zu sein. Vielen Dank für das Vertrauen, die motivierende Art und die sehr gute Begleitung.

Besonderen Dank an Frau Luise Rauch für die tolle Betreuung, für die Einarbeitung und die Begleitung während der experimentellen Zeit und für die stetige Hilfsbereitschaft.

Grossen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Torsten Lowin für das Korrekturlesen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Christian Hien und Frau Michaela Hien für die Unterstützung, Motivation und Verständnis.

Lieben Dank an meinen Ehemann Radoslaw Malinowski und an meine Tante Dipl. Ing. Dobrina Andreeva.

Danke an alle, die an diesem Projekt teilgenommen haben:

Dr. Valentin S. Schäfer, PD Dr. Med. Boris Ehrenstein, Dario Boschiero,

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Grifka, Prof. Dr. med Martin Fleck.

Lieben Dank an meine grossartigen Eltern, dass sie mir meine Ausbildung ermöglicht haben und immer für mich da sind.

